

半合成ペニシリン TA-058 の *in vitro* 抗菌作用

山口東太郎・松下 忠弘・春日 修
 香山 恵子・前澤 功・石井 信男
 田辺製薬株式会社微生物研究所

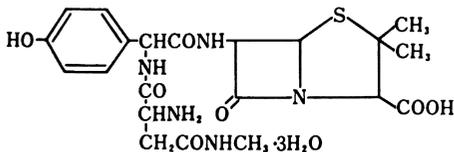
新しい半合成ペニシリン TA-058 の *in vitro* 抗菌試験を行い、以下の成績を得た。

- 1) TA-058 は、ABPC 類似の広範囲な抗菌スペクトルを示し、さらに *P. aeruginosa* に対して SBPC と同等の抗菌力を示した。
- 2) 臨床分離の *E. coli*, *P. mirabilis* および *H. influenzae* に対して、TA-058 は対照薬剤より優れた抗菌力を示した。
- 3) 抗菌力に及ぼす各種因子の影響を常法により検討したが、ほとんど影響はなく、*P. aeruginosa* に対する MIC が接種菌量の低下に伴って低くなったのみであった。
- 4) TA-058 は、*S. aureus*, *E. coli* および *P. aeruginosa* に対して ABPC および SBPC と同様に殺菌的に作用した。また、*E. coli* NIHJ JC-2 に対して TA-058 の 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の作用で溶菌像が観察された。
- 5) TA-058 は、グラム陰性桿菌の penicillinase により ABPC と同様加水分解をうけた。

緒 言

TA-058, (2S, 5R, 6R)-6-[2R-2-(2R-2-amino-3-N-methyl carbamoylpropionamido)-2-(4-hydroxyphenyl) acetamido]-3, 3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid trihydrate は、当社有機化学研究所の研究陣によって合成された半合成のペニシリンであり、Amoxicillin の α -アミノ基を N⁴-methyl-asparaginyl 化した誘導体である (Fig.1)¹⁾。ここでは、各種細菌について試験管内抗菌作用を既存のペニシリンと比較検討した結果を報告する。

Fig. 1 Chemical structure of TA-058



I 実験材料と方法

1. 使用薬剤

TA-058 (Lot. 000020), Ampicillin (ABPC, 明治製薬), Amoxicillin (AMPC, 藤沢薬品工業), Carbenicillin (CBPC, 藤沢薬品工業), Sulbenicillin (SBPC, 武田薬品工業), Piperacillin (PIPC, 富山化学), Benzylpenicillin (PCG, 明治製薬) および Cephalothin (CET, 塩野

義製薬) を使用した。

2. 試験菌株

標準菌株は、当研究所保存株を用いた。臨床分離株は、順天堂大学医学部中央検査室、大阪大学微生物病研究所および東北大学医学部第一内科の各施設から分与された株を用いた。

3. 抗菌力測定法

日本化学療法学会の最小発育阻止濃度測定法²⁾ に準じて MIC を測定した。増菌用培地は Trypto-soy broth (TSB, 栄研) を用い、*Streptococci* および *Neisseria* には非働化馬血清 (日本生物材料) を、*H. influenzae* には Bacto-Fieldes enrichment (Difco) をそれぞれ 5% 添加した。抗菌力測定培地は主として Heart infusion agar (HIA, 栄研) を用いたが、*Streptococci* は 10% 脱線維馬血液加 HIA を、*H. influenzae* および *Neisseria* には Trypto-soy agar (TSA, 栄研) を基礎培地とした Chocolate agar を、また嫌気性菌には GAM 寒天培地 (日水) を使用した。

接種菌液は増菌用培地で 37°C, 18~20 時間培養後、10⁸ cells/ml および 10⁶ cells/ml に調整し、接種装置により寒天平板上に接種した。なお、*Neisseria* は 10% 炭酸ガス存在下、37°C で約 20 時間培養した。

4. 抗菌力に及ぼす各種因子の影響

各種標準菌株について各種因子の抗菌力に及ぼす影響を寒天平板法あるいは液体希釈法によって検討した。試験培地には HIA, 普通寒天培地 (NA, 栄研), Antibiotic

Medium No. 1 (Difco) および Mueller Hinton Medium(Difco) を用いた。培地 pH の調整には 1N-HCl および 1N-NaOH を用い、血清は 56°C, 30 分非働化して使用した。

5. 耐性獲得試験

Heart infusion broth (HIB, 栄研) を用い、接種菌量 10^8 cells/ml にて、37°C で一夜培養して各試験薬剤の MIC を測定し、それぞれの $\frac{1}{2}$ MIC の薬剤を含む HIB に発育した菌液を接種菌液として以後経目的に MIC の変動を観察した。

6. 増殖曲線に及ぼす影響

37°C で一夜培養した菌液を HIB に約 $10^4 \sim 10^8$ cells/ml となるように接種し、*S. aureus* および *E. coli* の場合は 1.5 時間、*P. aeruginosa* の場合は 2 時間振盪培養した後、各種濃度の薬剤を添加し、さらに振盪培養を続けて以後経時的に培養液を採取し、混釈法により生菌数を測定した。

7. 最小殺菌濃度 (MBC) の測定

HIB を用いた液体希釈法によって接種菌量 10^4 cells/ml における MIC を測定し、MIC 以上の薬剤濃度を加えた試験管から一白金耳の培養液を薬剤無添加の HIA 上に画線し、37°C で一夜培養して、全く菌の発育しなかった最小濃度を MBC とした。

8. 薬剤による菌の形態変化の観察

一夜培養した *E. coli* NIHJ JC-2 および *P. aerugi-*

nosa TU-408 の菌液を HIB に約 10^7 cells/ml となるように接種し、2 時間振盪培養した後、2 倍希釈系列の薬剤を添加し、*E. coli* は 4 時間、*P. aeruginosa* は 6 時間それぞれ培養して菌の形態を光学顕微鏡下で観察した。また、同時に混釈法により生菌数を測定した。

9. β -lactamase に対する安定性

E. coli ML-1410 RGN-823, *E. coli* ML-1410 RGN-238, *P. vulgaris* GN76/c-1 および *C. freundii* GN-346 を HIB で 37°C, 一夜培養し、菌液を HIB で 20 倍に希釈した後、さらに 37°C で約 6 時間振盪培養し、遠心分離して菌体を集めた。一方、*S. aureus* No. 1052 および *P. rettgeri* GN-624 は、HIB で一夜培養した菌液を HIB で 20 倍希釈した後 37°C で約 4 時間振盪培養し、*S. aureus* No. 1052 には Methicillin を 0.5 μ g/ml, *P. rettgeri* GN-624 には PCG を 100 μ g/ml となるように添加し、さらに 1 時間培養を続けて β -lactamase を誘導させた。培養終了後、ただちに遠心分離して *S. aureus* No. 1052 は遠沈上清を粗酵素液として実験に供した。また、*P. rettgeri* GN-624 は遠心分離にて菌体を集めた。また、*B. fragilis* GAI-0558 は GAM broth (日水) で anaerobe box 中一夜培養後、遠心分離して菌体を集めた。ついで、それぞれの菌体を 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) の適量に懸濁し、冷却下で超音波処理して菌体を破碎し、その 100,000 \times g, 1 時間の遠沈上清を酵素液として用いた。ただし、*E. coli* ML-

Table 1 Antibacterial spectrum of TA-058, ABPC, SBPC and CBPC (Gram-positive bacteria)

Test strain	MIC(μ g/ml)			
	TA-058	ABPC	SBPC	CBPC
<i>S. aureus</i> 209-P JC-1	0.39	0.03	0.78	0.39
<i>S. aureus</i> Terajima	1.56	0.09	3.13	0.78
<i>S. aureus</i> Smith	1.56	0.05	1.56	0.78
<i>S. aureus</i> 199-R	3.13	12.5	3.13	6.25
<i>S. epidermidis</i> 10131	0.78	0.05	0.78	0.78
<i>S. epidermidis</i> Kawamura	1.56	0.05	1.56	0.39
<i>S. pyogenes</i> D-58*	0.04	0.01	0.16	0.16
<i>S. pyogenes</i> 9-76*	0.16	0.02	0.64	0.32
<i>S. pneumoniae</i> IID-553*	0.16	0.04	1.25	0.64
<i>S. pneumoniae</i> IID-554*	0.16	0.04	2.5	0.64
<i>S. faecalis</i> CN-478	3.13	1.56	25	25
<i>S. faecalis</i>	6.25	1.56	25	25
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	≤ 0.05	≤ 0.05	0.2	≤ 0.05
<i>C. diphtheriae</i> *	0.32	0.02	0.64	0.32
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0.2	0.2	0.2	0.2

Method: Heart infusion agar, 10^6 cells/ml, stamp method, 37°C, 20 hrs.

*: Supplemented with 10% horse blood

Table 2 Antibacterial spectrum of TA-058, ABPC, SBPC and CBPC (Gram-negative bacteria)

Test strain	MIC(μ g/ml)			
	TA-058	ABPC	SBPC	CBPC
<i>N. meningitidis</i> 1307*	\leq 0.01	0.03	0.03	0.03
<i>N. gonorrhoeae</i> T-1*	\leq 0.01	0.03	0.03	0.03
<i>N. gonorrhoeae</i> Yoshikawa*	\leq 0.01	0.05	0.2	0.39
<i>N. gonorrhoeae</i> IID 844*	0.03	0.1	0.1	0.1
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	3.13	3.13	6.25	6.25
<i>E. coli</i> 1346	\leq 0.2	0.39	0.78	0.78
<i>E. coli</i> ML-1410 RGN-823	>100	>100	>100	>100
<i>C. freundii</i> TU-971	12.5	>100	12.5	6.25
<i>C. freundii</i> GN-346	>100	>100	>100	>100
<i>S. typhi</i> T-58	0.39	0.39	1.56	1.56
<i>S. typhimurium</i>	0.39	0.2	0.78	0.78
<i>S. flexneri</i> 2a	0.39	0.39	3.13	1.56
<i>S. sonnei</i>	1.56	3.13	6.25	6.25
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	100	50	>100	>100
<i>K. oxytoca</i> 5075	>100	>100	>100	>100
<i>E. cloacae</i> TL-14	1.56	25	6.25	1.56
<i>S. marcescens</i> 7006	1.56	6.25	6.25	6.25
<i>S. marcescens</i> OU-29	100	>100	100	25
<i>P. vulgaris</i> IID-874	0.2	0.2	0.39	0.39
<i>P. vulgaris</i> 6028	1.56	6.25	0.78	0.78
<i>P. vulgaris</i> GN-76/c-1	>100	>100	12.5	25
<i>P. mirabilis</i> TU-1698	\leq 0.2	0.78	0.78	0.78
<i>P. morgani</i> Kono	12.5	50	1.56	0.78
<i>P. morgani</i> 6501	>100	>100	25	3.13
<i>P. rettgeri</i> 6256	50	12.5	25	12.5
<i>P. rettgeri</i> 6259	12.5	12.5	0.78	0.78
<i>P. inconstans</i> 6761	6.25	6.25	0.78	1.56
<i>P. inconstans</i> 6764	50	25	1.56	0.78
<i>P. aeruginosa</i> PI-67	6.25	>100	6.25	12.5
<i>P. aeruginosa</i> No. 12	6.25	>100	25	50
<i>P. aeruginosa</i> 35R	12.5	>100	50	100
<i>P. aeruginosa</i> 4098	0.78	>100	3.13	6.25
<i>H. influenzae</i> 7521*	\leq 0.05	0.2	0.39	0.2
<i>H. influenzae</i> 7554*	0.39	6.25	0.78	0.78

Method: Heart infusion agar, 10^6 cells/ml, stamp method, 37 °C, 20 hrs.

*: Chocolate agar (10% horse blood)

1410 RGN-238 は、遠沈上清を Sephadex G 100 でゲル濾過し、一段階精製して使用した。

β -lactamase 活性の測定は、澤井らの Sargent 法改良法³⁾にて行った。

II 実験成績

1. 抗菌スペクトル

グラム陽性菌、グラム陰性菌および偏性嫌気性菌に対する TA-058 および対照薬剤の MIC を Table 1 ~ Table 3 に示した。TA-058 の抗菌スペクトルは、対照薬剤と同様に広範囲であり、グラム陽性菌に対し全般に SBPC より強く、ABPC よりやや弱かった。また TA-058 は Staphylococci については CBPC と抗菌活性は等しいが、Streptococci に対しては明らかに強い活性

Table 3 Antibacterial spectrum of TA-058, ABPC, SBPC and CBPC (Anaerobic bacteria)

Test strain	MIC(μ g/ml)			
	TA-058	ABPC	SBPC	CBPC
<i>C. perfringens</i>	0.2	0.2	0.2	0.2
<i>C. botulinus</i> Type A	0.39	0.2	0.39	0.39
<i>C. botulinus</i> Type B	0.78	0.2	0.2	0.39
<i>C. tetani</i>	0.39	0.2	0.2	0.78
<i>P. acnes</i> ATCC 11828	0.39	0.2	1.56	1.56
<i>P. variabilis</i> ATCC 14955	0.2	0.2	0.78	0.78
<i>P. anaerobius</i>	3.13	0.2	1.56	3.13
<i>E. aerofaciens</i> ATCC 25986	0.39	0.2	12.5	3.13
<i>B. melaninogenicus</i> O-33	6.25	1.56	1.56	3.13
<i>B. thetaiotaomicron</i> GM-7006	12.5	25	50	25
<i>B. fragilis</i> GM-7004	>100	>100	>100	>100
<i>F. nucleatum</i> U-5	0.2	0.2	0.2	0.39
<i>F. varium</i> ATCC 8501	0.78	0.78	3.13	1.56
<i>V. parvula</i> NH-5	0.78	0.2	1.56	3.13

Method: GAM agar, 10^6 cell/ml, stamp method, 37°C, 48hrs. incubation in anaerobe box (H_2 10%, CO_2 10% and N_2 80%)

Table 4 Influence of various factors on MIC of TA-058 and other penicillins

Factor	Test strain Drug	<i>S. aureus</i> 209-P JC-1			<i>E. coli</i> NIHJ JC-2			<i>P. aeruginosa</i> TU-408			
		TA-058	AMPC	SBPC	TA-058	AMPC	SBPC	TA-058	CBPC	SBPC	
(a) Medium*	HI	0.78	≤ 0.05	1.56	3.13	6.25	6.25	6.25	50	25	
	MH	0.78	0.1	1.56	6.25	6.25	6.25	12.5	25	12.5	
	NA	0.78	≤ 0.05	1.56	3.13	3.13	3.13	6.25	50	25	
	No. 1	0.39	0.1	1.56	1.56	1.56	1.56	3.13	50	25	
(b) Human serum (%)	Agar** dilution	0	0.78	0.1	1.56	3.13	6.25	6.25	12.5		25
		5	0.78	0.1	1.56	3.13	6.25	6.25	12.5		25
		10	0.78	0.1	1.56	3.13	6.25	6.25	12.5		25
		25	0.78	0.1	1.56	3.13	6.25	6.25	12.5		25
		50	0.78	0.1	1.56	3.13	12.5	12.5	12.5		25
	Tube*** dilution	0	1.56	0.1	3.13	6.25	12.5	25	25		50
		10	1.56	0.1	3.13	6.25	12.5	25	25		50
		25	1.56	0.2	3.13	6.25	25	25	50		50
		50	1.56	0.2	3.13	6.25	25	25	50		50
		(c) pH**	9	0.78	0.1	1.56	6.25	25	12.5	25	50
	7	0.78	0.1	3.13	3.13	12.5	6.25	12.5	50	25	
	5	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05	3.13	1.56	12.5	3.13	50	50	
(d) Inoculum size**** (cells/ml)	10^8	3.13			3.13			12.5	50	25	
	10^7	3.13	0.1	1.56	3.13	12.5	6.25	12.5	50	25	
	10^6	1.56	≤ 0.05	1.56	3.13	12.5	6.25	3.13	50	25	
	10^5	1.56	≤ 0.05	1.56	3.13	6.25	6.25	1.56	50	12.5	
	10^4	0.78	≤ 0.05	0.39	3.13	6.25	3.13	1.56			

* HI: Heart infusion agar (Eiken)
 MH: Mueller-Hinton Medium (Difco)
 NA: Nutrient agar (Eiken)
 No. 1: Antibiotic Medium No. 1 (Difco)
 ** Heart infusion agar

*** Heart infusion broth
 **** Heart infusion agar
S. aureus 209-P JC-1: 5.6×10^8
E. coli NIHJ JC-2: 8.0×10^8
P. aeruginosa TU-408: 2.8×10^8

を示した。

グラム陰性菌の場合は、菌種によって感受性に差異があったが、TA-058 は SBPC および CBPC と同様に *P. aeruginosa* に抗菌力を有する点で ABPC と相違し、その他の菌種に対しては ABPC と類似したスペクトルを示した。また、TA-058 は *Neisseria* 属および *H. influenzae* に対して対照薬剤より数倍強い抗菌力を示した。一方、I 型 (TEM 型) penicillinase 産生を支配する R-プラスミドを持った *E. coli* ML-1410 RGN-823 に対して TA-058 は対照薬剤と同様に効果がなかった。偏性嫌気性菌に対して、TA-058 は対照薬剤とほぼ同等の抗菌力を示した。

2. 抗菌力に及ぼす各種因子の影響

MIC の測定に及ぼす各種因子の影響を 3 菌種について検討した成績を Table 4 に示す。

(a) 培地の種類の影響

4 種の培地を用いて MIC を測定したところ、TA-058 が Antibiotic Medium No. 1 で若干小さな MIC を示

す傾向が認められたのみで、各試験薬剤とも著しい MIC の変化を示さなかった。

(b) 人血清添加の影響

HIB および HIA に人血清を添加しその影響を検討したが、TA-058 および対照薬剤の MIC 値は液体希釈法でも寒天平板希釈法でも、すべての 50% までの血清濃度で有意の変化を示さなかった。

(c) 培地 pH の影響

HIA の pH を酸性、中性およびアルカリ性とし、3 菌種に対する MIC の変化を調べた。*S. aureus* 209 P JC-1 および *P. aeruginosa* TU-408 において、酸性条件における TA-058 の MIC は中性およびアルカリ性域における値よりも低値を示した。

(d) 接種菌量の影響

接種菌液を $10^4 \sim 10^8$ cells/ml に調整し、寒天平板希釈法によって TA-058 および対照薬剤の MIC の変化を調べた。*S. aureus* 209 P JC-1 および *E. coli* NIHJ JC-2 において、TA-058 の MIC の変動は著明ではなかった

Fig. 2 Sensitivity distribution of 65 clinical isolates

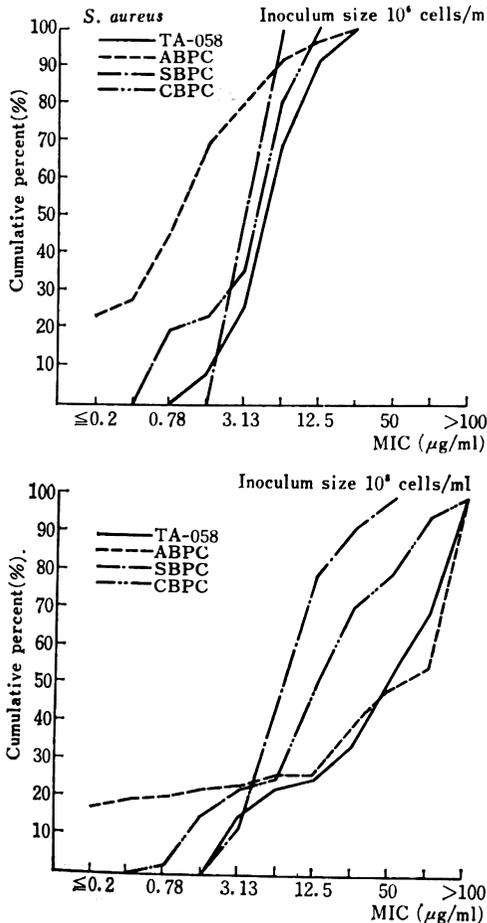
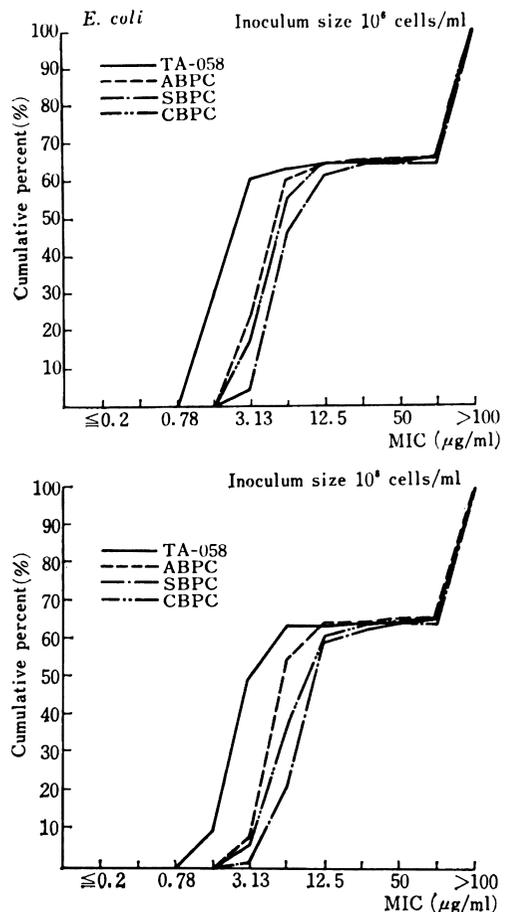


Fig. 3 Sensitivity distribution of 95 clinical isolates



が、*P. aeruginosa* TU-408 に対する MIC は接種菌量の減少によって低下した。

4. 臨床分離株の感受性分布

臨床材料から分離された各種細菌について TA-058 および対照薬剤の MIC を測定し、その成績を Fig. 2~ Fig. 8 に示した。

(a) *S. aureus* 65 株 (Fig. 2) : 10^6 cells/ml 接種における TA-058 の MIC は $1.56 \sim 25 \mu\text{g/ml}$ に分布し標準菌株におけるそれと同様、ABPC より抗菌力は弱かったが、SBPC および CBPC とほぼ同程度であった。約 70% の試験菌株に対する TA-058 の MIC は $6.25 \mu\text{g/ml}$ 以下に分布した。

一方、 10^8 cells/ml 接種では TA-058 および対照薬剤の MIC が耐性側に移動し、この傾向は ABPC で顕著であった。

(b) *E. coli* 95 株 (Fig. 3) : 10^6 cells/ml 接種における TA-058 の MIC は $1.56 \sim >100 \mu\text{g/ml}$ に分布し、被検菌株の約 60% が MIC $3.13 \mu\text{g/ml}$ 以下に分布し

た。また、 $>100 \mu\text{g/ml}$ の MIC の菌株が対照薬剤と同様に約 40% 認められた。

95 菌株のうち、TA-058 に感受性を示す 61 菌株は MIC $12.5 \mu\text{g/ml}$ 以下に分布し、そのうち 93% の菌株は MIC $3.13 \mu\text{g/ml}$ 以下に分布し対照薬剤より強い抗菌力を示した。

10^8 cells/ml 接種時の各薬剤に対する感受性分布は 10^6 cells/ml 接種時と大差なく、TA-058 および対照薬剤とも接種菌量の影響はほとんど認められなかった。

(c) *K. pneumoniae* 70 株 (Fig. 4) : TA-058 の 10^6 cells/ml 接種における MIC は $3.13 \sim >400 \mu\text{g/ml}$ に分布し、ABPC に次ぐ抗菌活性を示したが、本剤を含むすべての試験薬剤の *K. pneumoniae* の大多数の菌株に対する MIC は $12.5 \mu\text{g/ml}$ 以上であった。

(d) *P. mirabilis* 69 株 (Fig. 5) : 10^6 cells/ml 接種における TA-058 の MIC は $\leq 0.2 \sim >100 \mu\text{g/ml}$ に分布し、被検菌株の 80% が MIC $0.78 \mu\text{g/ml}$ 以下に分布した。本菌種に対して TA-058 は、*E. coli* と同様対照

Fig. 4 Sensitivity distribution of 70 clinical isolates

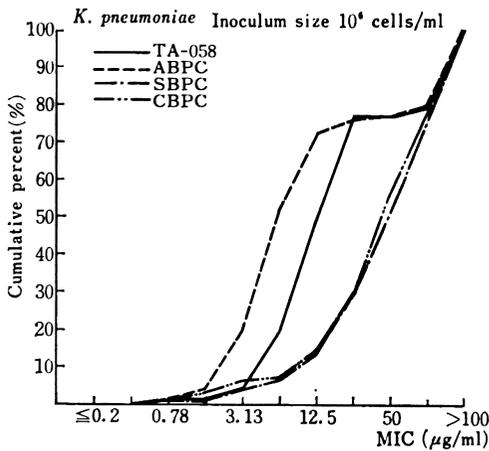
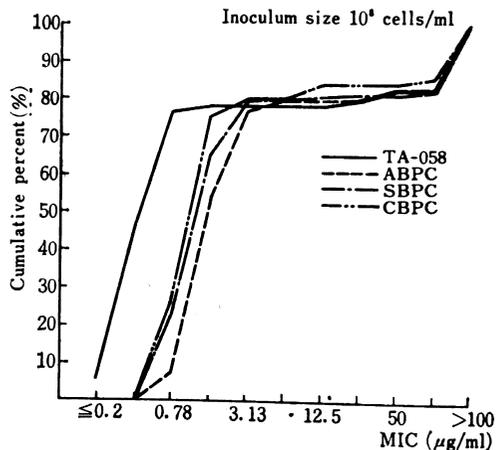
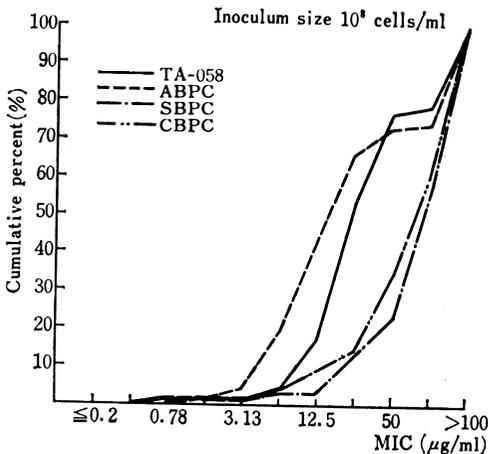
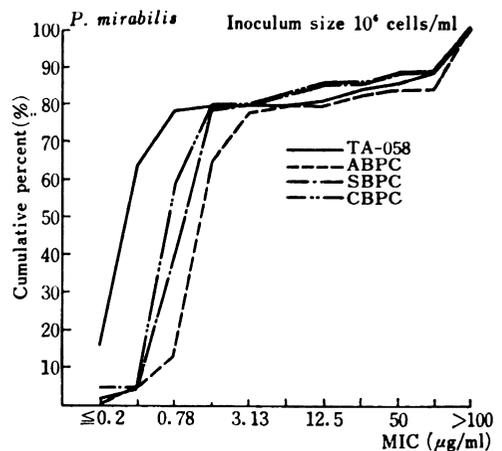


Fig. 5 Sensitivity distribution of 69 clinical isolates



薬剤より強い抗菌力を示した。また被験菌株の約10%が TA-058 に $>100 \mu\text{g/ml}$ の MIC を示したが対照薬剤も同様であった。

10^8 cells/ml を接種した場合にも、TA-058 および対照薬剤は 10^6 cells/ml 接種時と同様の感受性分布を示し、接種菌量の影響はほとんど認められなかった。

(e) インドール陽性 *Proteus* 属 102 株 (Fig. 6) : 10^6 cells/ml 接種における TA-058 の MIC は $\leq 0.2 \sim >100 \mu\text{g/ml}$ に幅広く分布した。本剤を含む試験薬剤のうち、SBPC および CBPC が強い抗菌力を示し約 80% の菌株が MIC $3.13 \mu\text{g/ml}$ 以下に分布した。TA-058 は ABPC より若干強い抗菌力を示したが、その抗菌力は SBPC および CBPC より弱く、MIC $50 \mu\text{g/ml}$ 以下に約 80% の菌株が分布した。

接種菌量を 10^8 cells/ml にすると、各薬剤とも MIC が大きくなり、TA-058 および ABPC では $>100 \mu\text{g/ml}$ の MIC を示す菌株が最も多くなった。

(f) *P. aeruginosa* 155 株 (Fig. 7) : 10^6 cells/ml 接

Fig. 6 Sensitivity distribution of 102 clinical isolates

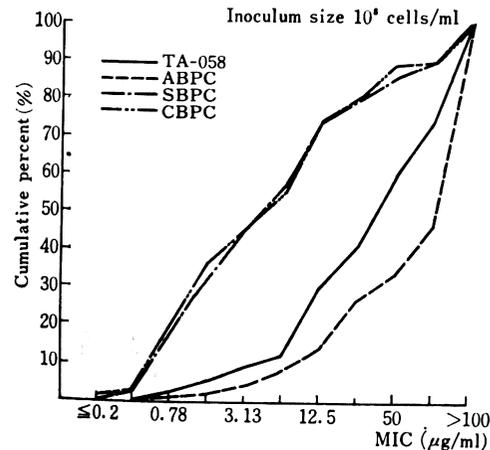
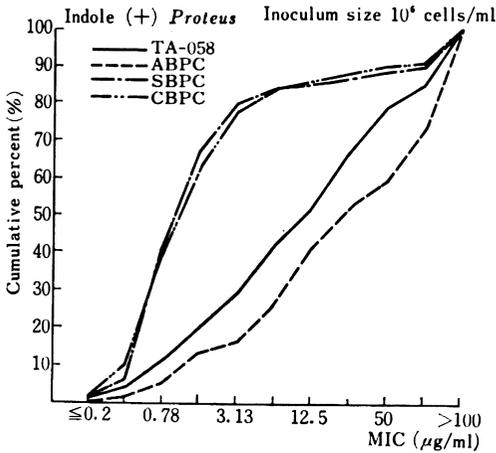


Fig. 7 Sensitivity distribution of 155 clinical isolates

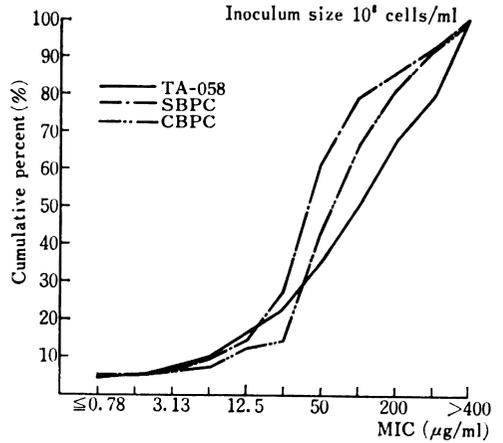
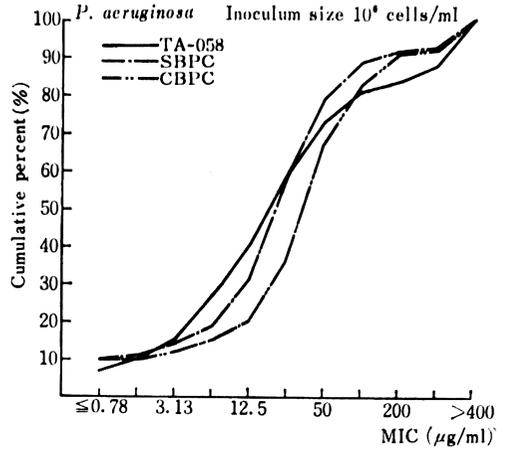


Fig. 8 Sensitivity distribution of 21 clinical isolates

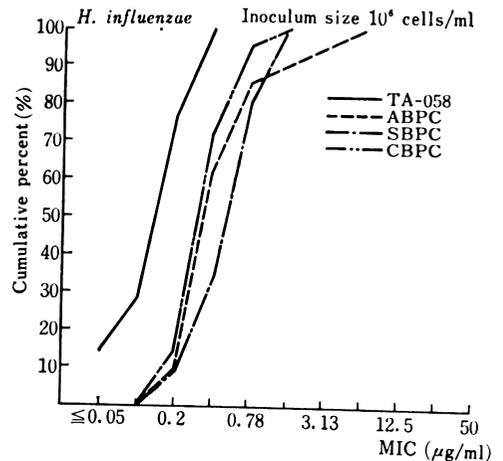
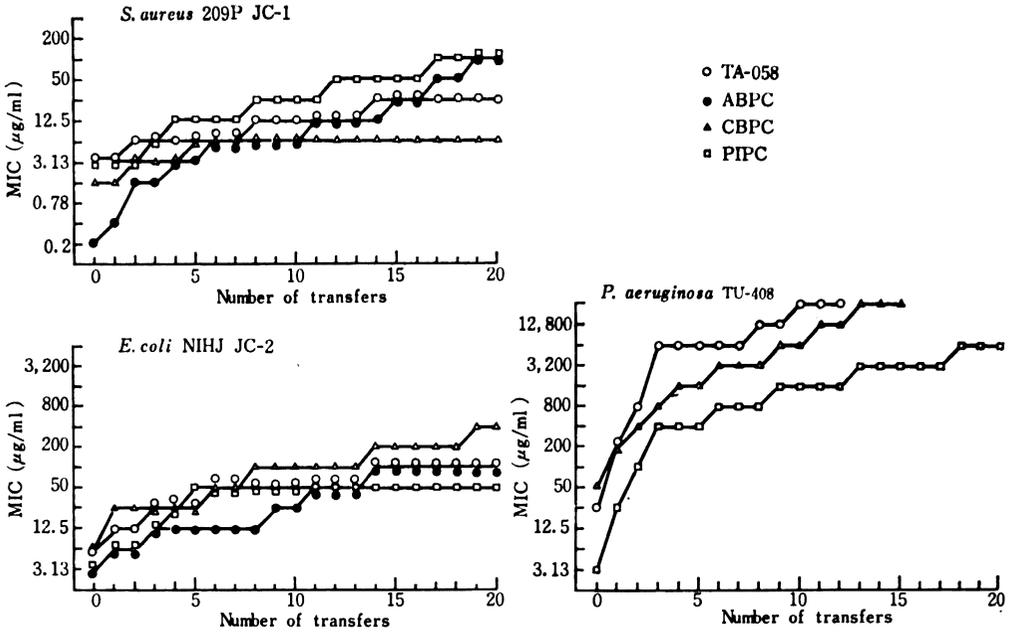
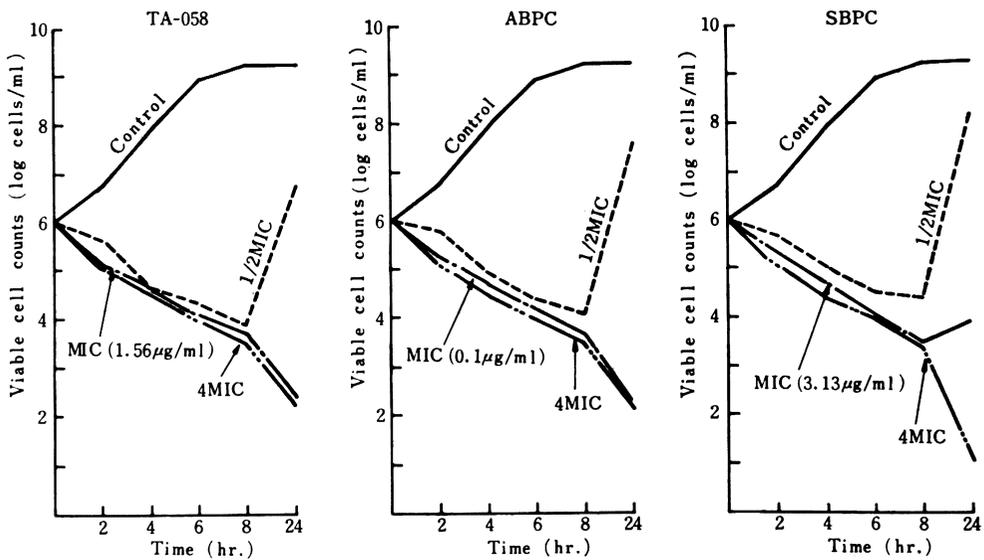


Fig. 9 Development of drug resistance to TA-058 and other penicillins

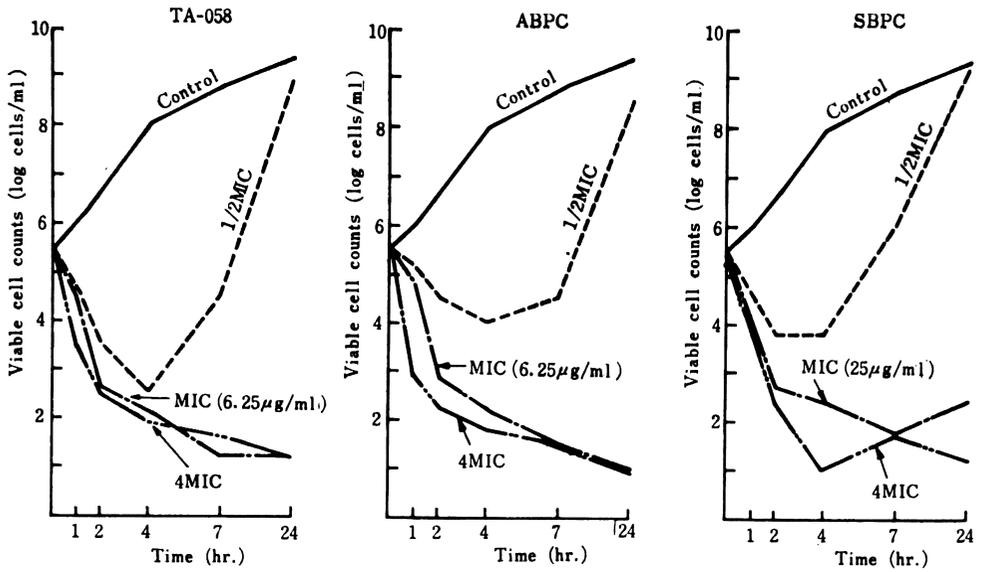


Medium: Heart infusion broth
 Inoculum size: 10^5 cells/ml
 Incubation: 37°C , 24hrs

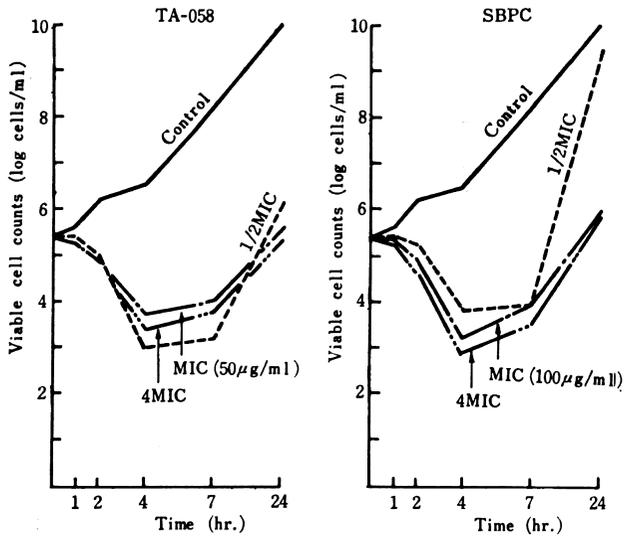
Fig. 10 Bactericidal activity of TA-058, ABPC and SBPC against *S. aureus* 209-P JC-1



Medium: Heart infusion broth
 Incubation: 37°C , shaking culture

Fig. 11 Bactericidal activity of TA-058, ABPC and SBPC against *E. coli* NIHJ JC-2

Medium: Heart infusion broth
Incubation: 37°C, shaking culture

Fig. 12 Bactericidal activity of TA-058 and SBPC against *P. aeruginosa* TU-408

Medium: Heart infusion broth
Incubation: 37°C, shaking culture

種における TA-058 の MIC は $\leq 0.78 \sim > 400 \mu\text{g/ml}$ に分布し、その抗菌力は CBPC より強く SBPC と同等であった。MIC $25 \mu\text{g/ml}$ 以下に分布する菌株の比率は、TA-058 が 57%, SBPC は 56%, そして CBPC は 33% であった。

接種菌量を 10^8 cells/ml とした場合、CBPC および SBPC は MIC が約 2 倍程大きくなり、MIC $50 \mu\text{g/ml}$ における阻止率は SBPC が 61%, CBPC が 42% であった。TA-058 は対照薬剤より接種菌量の影響を強くうけ、MIC $50 \mu\text{g/ml}$ における阻止率は 35% であった。

(g) *H. influenzae* 21 株 (Fig. 8): TA-058 の MIC は $\leq 0.05 \sim 0.39 \mu\text{g/ml}$ に、ABPC は $0.2 \sim 6.25 \mu\text{g/ml}$ に、SBPC および CBPC は $0.2 \sim 1.56 \mu\text{g/ml}$ に分布し、試験薬剤中で TA-058 が最も強い抗菌力を示した。また、被験菌株のうち 3 株が ABPC に $1.56 \mu\text{g/ml}$ 以上の MIC を示したが、この 3 株に対する TA-058

の MIC は $0.39 \mu\text{g/ml}$ であった。

5. 耐性獲得試験

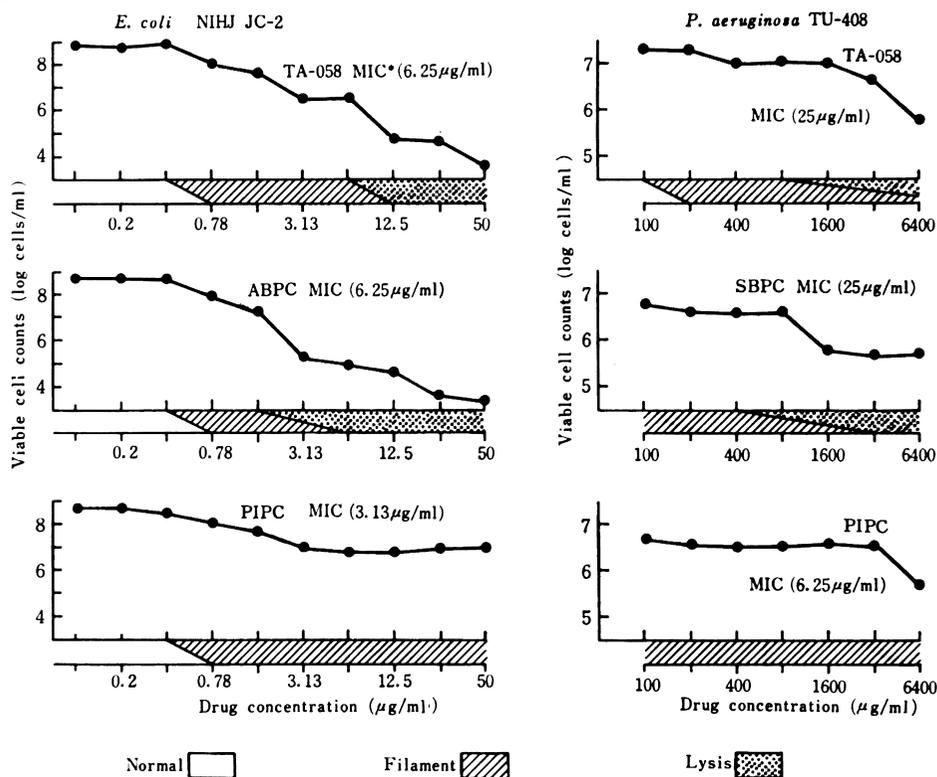
TA-058 および対照薬剤に対する *S. aureus* 209 P JC-1, *E. coli* NIHJ JC-2 および *P. aeruginosa* No. 12 の耐性獲得を増量継代法によって調べた。各薬剤に対する試験菌の耐性化傾向には大差がなかった (Fig. 9)。

6. 増殖曲線に及ぼす影響

S. aureus 209 P JC-1, *E. coli* NIHJ JC-2 および *P. aeruginosa* TU-408 に対する殺菌効果を生菌数の経時的測定によって調べた。

(a) *S. aureus* 209 P JC-1 (Fig. 10): TA-058 は MIC ($1.56 \mu\text{g/ml}$) の $\frac{1}{2}$ 濃度を添加により生菌数は 10^8 cells/ml から 6 時間後には 10^4 cells/ml に減少したが、以後再増殖し 24 時間で 5×10^8 cells/ml に回復した。MIC 以上の TA-058 の存在下では 6 時間以後も生菌数が減少を続け、24 時間後には 10^2 cells/ml となった。

Fig. 13 Effect of TA-058 and other penicillins on morphological changes and viable cell counts



Medium: Heart infusion broth

Incubation time: *E. coli* NIHJ JC-2 (4hrs), *P. aeruginosa* TU-408 (6hrs)

Inoculum size: *E. coli* NIHJ JC-2 (10^8 cells/ml), *P. aeruginosa* TU-408 (10^7 cells/ml)

* MIC was determined by tube dilution method using heart infusion broth inoculated 10^5 cells/ml of test organisms

ABPC および SBPC を同じ条件で作用させたが、各濃度における生菌数の変化は TA-058 と同じであった。

(b) *E. coli* NIHJ JC-2 (Fig. 11): TA-058 の 1/2 MIC を作用させると 4 時間まで生菌数が減少したが、その後再増殖が見られ、24 時間では 10^9 cells/ml と薬剤無添加の対照と同程度まで菌数は回復した。本剤を MIC 以上の濃度で作用させると再増殖がなく、24 時間後に 10 cells/ml まで減少した。

ABPC および SBPC を全く同じ条件で作用させたが、各濃度とも生菌数は TA-058 と同様の傾向を示した。

(c) *P. aeruginosa* TU-408 (Fig. 12): TA-058 および SBPC の $\frac{1}{2}$ ~4MIC の存在下における生菌数の変化には大差がなかった。すなわち両薬剤のこれら濃度における存在下で生菌数は 4 時間後まで減少したが、その後 24 時間まで増殖傾向を示した。

TA-058 は対照薬剤と同様 3 菌種に殺菌的に作用した。TA-058 を含む各薬剤の $\frac{1}{2}$ 濃度においても、接触初期には殺菌的に作用した。

7. 形態変化の観察

E. coli NIHJ JC-2 および *P. aeruginosa* TU-408 に TA-058 および対照薬剤を作用させた時の形態変化を Fig. 13 に示した。また同時に、測定した生菌数の変化も併せて図示した。

(a) *E. coli* NIHJ JC-2

TA-058 の 0.1~0.39 $\mu\text{g/ml}$ を 4 時間作用させても形態変化はみられなかったが、0.78~6.25 $\mu\text{g/ml}$ を 4 時間作用させると filament 像が観察され、生菌数も TA-058 の濃度の増加に伴いゆるやかな減少を示した。TA-058 の 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度を 4 時間作用させる

と、完全に溶菌し、生菌数の減少も著明であった。

しかし、PIPC では 0.78~50 $\mu\text{g/ml}$ 以上にわたって filament 像が観察され、溶菌像は認められなかった。この形態学的観察結果は生菌数の消長と対応した。

(b) *P. aeruginosa* TU-408

TA-058 の 100~6,400 $\mu\text{g/ml}$ を 6 時間作用させると 100 $\mu\text{g/ml}$ では形態の変化はみられなかったが、200~800 $\mu\text{g/ml}$ では filament 像のみが観察され、1,600 $\mu\text{g/ml}$ ~6,400 $\mu\text{g/ml}$ では filament 像と溶菌像が観察されたが、濃度の増加に伴い溶菌像の占める率が高くなった。また生菌数は溶菌像が明らかに観察される 3,400 $\mu\text{g/ml}$ より減少した。

SBPC は ≤ 100 ~1,600 $\mu\text{g/ml}$ で filament 像が観察され 800 $\mu\text{g/ml}$ 以上で溶菌像がみられた。溶菌像が明らかにみられる 1,600 $\mu\text{g/ml}$ 以上では生菌数が減少した。

PIPC は ≤ 100 ~6,400 $\mu\text{g/ml}$ で filament 像のみが観察された。生菌数は 3,200 $\mu\text{g/ml}$ で全く変化がなく、6,400 $\mu\text{g/ml}$ で溶菌像が見られないにもかかわらずやや減少した。

8. 最小殺菌濃度 (MBC)

臨床分離の *S. aureus*, *E. coli*, および *P. aeruginosa* について TA-058 および対照薬剤の MBC および MIC を液体希釈法で測定し、各試験薬剤の 3 菌種に対する MBC および MIC の累積分布のグラフより被験菌株数の 50% および 90% に相当する MBC および MIC の値を求め Table 5 に示した。

(a) *S. aureus* 15 株

TA-058 の *S. aureus* に対する MBC は、50% が 9.8

Table 5 Correlation of MBC and MIC of TA-058 and other penicillins against clinical isolates of *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa*

Test strains	Drug	MIC			MBC			Ratio of MBC/MIC	
		Range	50%	90%	Range	50%	90%	50%	90%
<i>S. aureus</i> 15 strains	TA-058	1.56-6.25	2.2	3.2	3.13-50	9.8	22.9	4.5	7.2
	ABPC	0.1-0.39	0.13	0.3	0.2-1.56	0.49	0.93	3.8	3.1
	SBPC	1.56-50	3.0	5.4	3.13-50	13.1	23.8	4.4	4.4
<i>E. coli</i> 38 strains	TA-058	1.56-6.25	2.6	5.0	3.13-50	2.8	5.4	1.1	1.1
	ABPC	3.13-25	4.5	8.5	3.13-100	5.1	11.2	1.1	1.3
	SBPC	6.25->100	9.6	23.1	6.25->100	12.1	36.7	1.3	1.6
<i>P. aeruginosa</i> 30 strains	TA-058	6.25-200	21.8	62.9	25->400	100	>400	4.6	6.4
	SBPC	12.5->400	29.7	159.1	25->400	118.1	>400	4.0	>2.6

MBC and MIC ($\mu\text{g/ml}$)

MBC and MIC were determined by tube dilution method using heart infusion broth inoculated 10^5 cells/ml of test bacteria.

Table 6 Stability of TA-058 and other penicillins to various β -lactamases

Enzyme source	β -Lactamase type	Specific ^{a)} activity (U/mg protein)	Relative rate of hydrolysis ^{b)}					
			PCG	CET	TA-058	ABPC	SBPC	CBPC
<i>S. aureus</i> No. 1052	PCase V	ND	100	ND	88.2	219	6.7	115
<i>E. coli</i> ML-1410 R _{GN} -823	PCase I	2	100	ND	174	183	11	22
<i>E. coli</i> ML-1410 R _{GN} -238	PCase II	1.32	100	ND	310	554	48	88
<i>P. vulgaris</i> GN76/c-1	CSase	1.78	ND	100	10	7	<2	<2
<i>P. rettgeri</i> GN-624	CSase	0.367	ND	100	<2	<2	<2	<2
<i>C. freundii</i> GN-346	CSase	1.05	ND	100	<2	<2	<2	<2
<i>B. fragilis</i> GAI-0558	CSase	0.168	ND	100	0.09	1.41	ND	0.83

a) One unit of the enzyme activity is expressed as 1 μ mole substrate hydrolyzed/min at 30°C and pH 7.0

b) The amount of hydrolyzed substrate was assayed by a modified procedure of Sargent's method

μ g/ml, 90%が22.9 μ g/mlであった。試験薬剤のなかでは ABPC が最も低い MBC 値を示したが、TA-058 のそれは SBPC とほぼ同程度であった。MIC に対する MBC の比は ABPC が若干低い値であったが、TA-058 を含む試験薬剤間に大差はなかった。

(b) *E. coli* 39 株

TA-058 の *E. coli* に対する MBC は、50%が 2.8 μ g/ml, 90%が 5.4 μ g/ml で試験薬剤中本剤が最も低値であった。本菌種の場合、各試験薬剤とも MBC と MIC が一致して強い殺菌力を示した。

(c) *P. aeruginosa* 30 株

TA-058 の *P. aeruginosa* に対する MBC は、50%が 100 μ g/ml, 90%が 400 μ g/ml であった。本菌種に対する TA-058 の MBC の MIC に対する比は 50%が 4.6 で SBPC より若干大きいもののほぼ同程度であった。

9. β -lactamase に対する安定性

TA-058 の β -lactamase に対する安定性を penicillinase (PCase と略す) および cephalosporinase (CSase と略す) について検討し、その成績を Table 6 に示した。

S. aureus No. 1052 の産生する PCase に対し、TA-058 は PCG および CBPC と同程度に加水分解された。試験薬剤のなかでは、ABPC が最も不安定で PCG の 2.2 倍の速度で加水分解され、SBPC は比較的安定であった。

TA-058 は、*E. coli* ML-1410 R_{GN}-823 の産生する I 型 PCase により ABPC とほぼ等しい速度で加水分解され、SBPC および CBPC は同酵素に対して比較的安定であった。*E. coli* ML-1410 R_{GN}-238 の産生する II 型 PCase によっても TA-058 の加水分解速度は AB

PC より遅かったが、SBPC および CBPC よりは速く不安定であった。

一方、*P. rettgeri* GN-624 および *C. freundii* GN-346 の産生する菌種特異的な CSase に対し、TA-058 および対照薬剤はいずれも CET に比べ加水分解をうけにくく、安定であった。また、TA-058 は *P. vulgaris* GN 76/c-1 の産生する CSase により ABPC より若干加水分解をうけ易く、SBPC および CBPC は同酵素に安定であった。

考 察

新しい半合成ペニシリン TA-058 の抗菌スペクトルは総じて ABPC と類似し (Table 1 ~ 3), 加えて *P. aeruginosa* に SBPC と同等の抗菌活性があり、ABPC 感受性の *E. coli*, *P. mirabilis* および *H. influenzae* に対して試験薬剤中最も強い抗菌力を示した。

TA-058 の殺菌力について検討した結果、*P. aeruginosa* に強い抗菌活性を示すが⁴⁾, spheroplast 形成能の低い PIPC⁵⁾ と異なり、その殺菌作用は従来のペニシリン誘導体と同様に強く (Fig. 10~13), 菌の形態変化の観察においても溶菌像が比較的低濃度で見られた。

試験管内抗菌作用を検討した結果、TA-058 はグラム陽性菌 および *P. aeruginosa* を含むグラム陰性菌に有効で、かつ ABPC を代表とする従来のペニシリン誘導体の特徴である強い殺菌作用を持っていることが明らかになった。

文 献

- 1) WAGATSUMA, M; M. SETO, T. MIYAGISHIMA, T. YAMAGUCHI, S. OHSHIMA & M. KAWAZU: Synthesis and antibacterial activity of asp-

- aragine derivatives of aminobenzylpenicillin.
J. Antibiotics 36(2) : 147~154, 1983
- 2) MIC 測定法改訂委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について。Chemotherapy 22 : 1126~1128, 1974
- 3) 澤井哲夫, 高橋 郁子: β -ラクタマーゼ活性の測定法とその応用。蛋白質・核酸・酵素 23 : 391~400, 1978
- 4) 植尾健次, 田井 賢, 林 敏雄, 福岡義和, 三橋 進: T-1220 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について。Chemotherapy 25(5) : 700~718, 1977
- 5) 西野武志, 山岸純一, 渡辺泰雄, 中沢昭三: 緑膿菌に対する T-1220 の抗菌像について。Chemotherapy 25(5) : 755~763, 1977

IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF TA-058, A NEW SEMISYNTHETIC PENICILLIN

TOUTARO YAMAGUCHI, TADAIHIRO MATSUSHITA, OSAMU KASUGA,
KEIKO KOUYAMA, ISAO MAEZAWA and NOBUO ISHII
Microbiological Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.

In vitro antibacterial activity of a new semisynthetic penicillin, TA-058, was tested and the following results were obtained :

- 1) Like ABPC, TA-058 showed a broad spectrum activity against gram-positive and gram-negative bacteria and it was as active as SBPC against *P. aeruginosa*.
- 2) Antibacterial activity of TA-058 against clinical isolates of *E. coli*, *P. mirabilis* and *H. influenzae* was superior to those of reference penicillins.
- 3) Examination of the effect of various factors on antibacterial activity of TA-058 revealed that the activity was almost not affected by the factors except for the inoculum size of *P. aeruginosa*.
- 4) TA-058 had a similar strong bactericidal activity to ABPC and SBPC. Lytic form of the bacterial cells (*E. coli* NIHJ JC-2) were observed by microscopic examination at concentrations more than 12.5 $\mu\text{g/ml}$ of TA-058.
- 5) TA-058 was hydrolyzed by penicillinases of gram-negative rod bacteria.